

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-165770

(43)Date of publication of application : 27.06.1995

(51)Int.Cl.

C07F 9/10
A61K 47/24
B01J 13/02

(21)Application number : 05-317026

(71)Applicant : NIPPON OIL & FATS CO LTD

(22)Date of filing : 16.12.1993

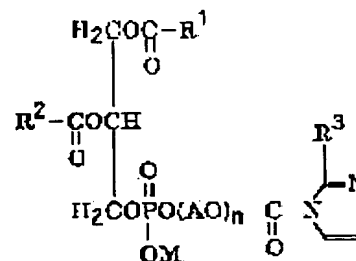
(72)Inventor : MIYAZAKI TAKESHI
MITSUCHIKA KOUZOU
YASUKOCHI TORU
NISHIDA MITSUHIRO
SUGINAKA AKINORI

(54) PHOSPHOLIPID DERIVATIVE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a phospholipid derivative represented by a specific formula, capable of simply and efficiently fixing various functional substances to the tip of a polyalkyleneoxide chain through covalent bonds in a large introduction amount, and useful for medicine carriers, etc.

CONSTITUTION: A derivative of the formula: $[R^1C(=O)]_n$ are each an acyl residual group of a 3-30C fatty acid; R^3 is H, methyl; AO is a 2-4C oxyalkylene; (n) is an average oxyalkylene addition mole number of 1-1000, when (n) is ≥ 2 , the oxyalkylene groups may mutually be same or different each other and be random or block addition reaction polymers; M is H, an alkali metal]. The objective derivative may be obtained e.g. by reacting a phospholipid with a polyalkylene glycol in the presence of a phospholipase D enzyme and subsequently reacting the obtained reactional product with N,N'-carbonyldiimidazole, etc.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.09.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3498339

[Date of registration] 05.12.2003

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-165770

(43)公開日 平成7年(1995)6月27日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 F 9/10	B	9155-4H		
A 6 1 K 47/24	B			
B 0 1 J 13/02		9342-4G	B 0 1 J 13/ 02	Z
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 8 頁)				

(21)出願番号 特願平5-317026

(22)出願日 平成5年(1993)12月16日

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72)発明者 宮崎 剛

茨城県つくば市梅園2-15-5

(72)発明者 三近 幸三

神奈川県川崎市川崎区藤崎2-3-9

(72)発明者 安河内 徹

神奈川県川崎市川崎区藤崎2-3-10

(72)発明者 西田 光広

兵庫県尼崎市武庫之荘西2-53

(72)発明者 杉中 昭典

神奈川県茅ヶ崎市室田2-4-10

(74)代理人 弁理士 柳原 成

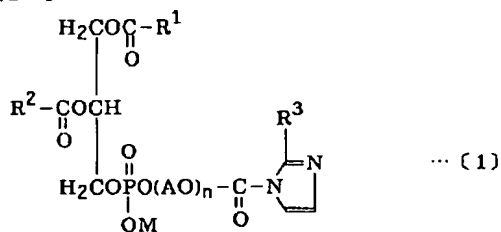
(54)【発明の名称】 リン脂質誘導体

(57)【要約】

【目的】 アミノ基などとの反応性に富むオキシカルボニルイミダゾール基をポリアルキレンオキシド鎖の先端に有し、リボソームなどの膜形成成分として用いた場合、リボソーム表面でポリアルキレンオキシド鎖の先端に機能性物質を容易に共有結合させることができる新規なリン脂質誘導体を得る。

【構成】 下式で表わされるリン脂質誘導体。

【化1】



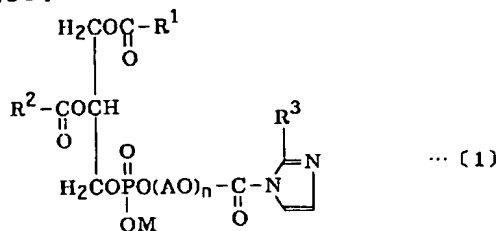
〔R¹、R²は炭素数2～29のアルキル基、R³はHまたはメチル基、AOは炭素数2～4のオキシアルキレン基、nは1～1000、MはHまたはアルカリ金属〕

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式〔1〕で表わされるリン脂質誘導体。

【化1】



〔式中、 $\text{R}^1\text{C}(=\text{O})$ および $\text{R}^2\text{C}(=\text{O})$ は炭素数3～30の脂肪酸のアシル残基を表わし、同一でも異なってもよい。 R^3 は水素原子またはメチル基、 AO は炭素数2～4のオキシアルキレン基、 n はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なってもよく、またランダム状に付加していても、ブロック状に付加していてもよい。 M は水素原子またはアルカリ金属原子を表わす。〕

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規かつ有用なリン脂質誘導体に関する。さらに詳しくは医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒、バイオリクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロカプセル代替品など、種々の機能性リボソームまたは脂肪乳剤等の小胞体の製造などに用いられるリン脂質誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】リボソームはリン脂質の二分子膜からなる小胞体であり、多分野での応用が試みられている。特に、医薬運搬体、診断・検出用のセンサーなどへの応用が注目されているが、リボソーム表面上または膜中に機能性物質を固定して各種機能をもたせること、およびリボソームの血中濃度を維持することなどが大きな課題となっている。

【0003】従来、リボソーム表面上または膜中への機能性物質の固定化に関しては、ブルラン誘導体で被覆したリボソームの表面上の多糖上に置換したアミノエチルカルバミルメチル基にγ-マレイミドブチルオキシサクシニミジルを介して抗体フラグメントを結合させる方法（Biochem. Biophys. Acta., 898, 323(1987)）、あるいはあらかじめリボソーム膜形成成分中に糖脂質を加えておき、リボソーム形成後過よう素酸化を行い、生じたアルデヒド基と抗体とを反応させて固定化する方法（J. Biol. Chem., 255, 10509(1980)）などがある。

【0004】しかし、これらの従来法では、リボソーム調製後にリボソーム膜表面上での多段階の化学反応を行

2

う必要があり、このため目的とする機能性物質の導入量が低く制限され、また反応による副生成物や不純物が混入し、リボソーム膜へのダメージが大きいなどの問題点がある。

【0005】一方、リボソームを生体内へ投与したとき、その多くは肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉されるため、十分な効果が得られないことが指摘されている（Cancer Res., 43, 5328(1983)）。そこで、この網内系器官で捕捉されてしまう問題点や、あるいはリボソーム自身の崩壊性・凝集性など安定性の低さに関する問題点を改善する方法として、リボソームの表面にポリエチレングリコール鎖を導入することが試みられている（例えば、特開平1-249717号公報、FEBS letters, 268, 235(1990)）。また、ポリエチレングリコールで修飾されたリボソームは、長期間にわたり血液中濃度を維持できることが明らかになっている（Biochem. Biophys. Acta., 1066, 29-36(1991)）。しかし、このような方法により得られるポリエチレングリコール鎖の導入されたリボソームは機能性物質と反応しないので、リボソーム表面上に機能性物質を固定化することはできない。

【0006】さらに、特開平4-346918号公報には、マレイミド基を有するリボソームにまずチオール基を付与したタンパク質（チオール化タンパク質）を反応させ、次いで残存マレイミド基にチオール基を付与したポリアルキレングリコール（チオール化ポリアルキレングリコール）部分を含む化合物を反応させることにより、網内系器官での取込の改善された薬剤含有抗体結合リボソームが得られることが記載されている。しかし、このリボソームでは、抗体がポリアルキレングリコール層の下部に隠蔽され、標的部位の抗原との反応が妨げられるため、期待される効果が十分には得られないという問題点がある。

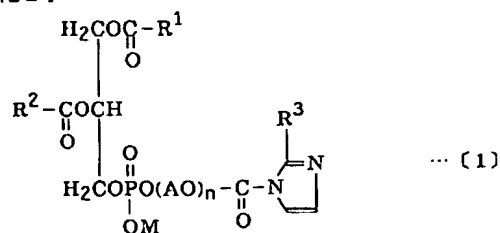
【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ポリアルキレンオキシド鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により固定化することができる新規かつ有用なリン脂質誘導体を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記一般式〔1〕で表わされるリン脂質誘導体である。

【化2】



〔式中、 $R^1C(=O)$ および $R^2C(=O)$ は炭素数3～30の脂肪酸のアシル残基を表わし、同一でも異なっているもよい。 R^3 は水素原子またはメチル基、 AO は炭素数2～4のオキシアルキレン基、 n はオキシアルキレン基の平均付加モル数で、1～1000の正数を表わす。 n が2以上の場合、オキシアルキレン基は同一でも異なっているもよく、またランダム状に付加しているも、ブロック状に付加しているもよい。 M は水素原子またはアルカリ金属原子を表わす。〕

【0009】一般式〔1〕において $R^1C(=O)$ 、 $R^2C(=O)$ で表わされる脂肪酸のアシル残基は、炭素数(カルボニル基の炭素も含む)3～30、好ましくは8～20のアシル残基である。このようなアシル残基の具体的なものとしては、プロピオン酸、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデカン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ソロチン酸、モンタン酸、メリシン酸、2-エチルヘキサン酸等の飽和脂肪酸のアシル残基；オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エルカ酸、2,4-オクタデカジエン酸等の不飽和脂肪酸のアシル残基；イソステアリン酸等の分岐脂肪酸のアシル残基；リシノール酸、12-ヒドロキシステアリン酸等のアルキル基中に水酸基を有する脂肪酸のアシル残基などがあげられる。

【0010】本発明のリン脂質誘導体をリボソームまたは脂肪乳剤などの製造に用いる場合は、 $R^1C(=O)$ 、 $R^2C(=O)$ で表わされる脂肪酸のアシル残基は、安定なリボソームまたは脂肪乳剤が形成できるという理由から、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、2,4-オクタデカジエン酸のアシル残基が好ましく、特にパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸のアシル残基が好ましい。 $R^1C(=O)$ と $R^2C(=O)$ とは同一であってもよいし、異なっているもよい。

【0011】一般式〔1〕の AO で表わされるオキシアルキレン基は、炭素数2～4のオキシアルキレン基であり、オキシエチレン基、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシ-1-エチルエチレン基、オキシ-1,2-ジメチルエチレン基、オキシテトラメチレン基などがあげられる。これらのオキシアルキレン基は、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、オキセタン、1-ブテンオキシド、2-ブテンオキシド、テトラヒドロフランなどのアルキレンオキシドを付加重合させた基である。一般式〔1〕の n は1～1000、好ましくは10～300、さらに好ましくは20～120の正数である。

【0012】 n が2以上の場合、オキシアルキレン基の種類は同一のもので、異なるものでもよい。後者の場合、ランダム状に付加しているも、ブロック状に付加しているもよい。親水性を付与する場合、 AO としてはエ

チレンオキシドが単独で付加したものが好ましく、この場合、 n が10以上のものが好ましい。また種類の異なるアルキレンオキシドが付加している場合、エチレンオキシドが20モル%以上、好ましくは50モル%以上付加しているのが望ましい。ポリアルキレンオキシド鎖に親油性を付与する場合はエチレンオキシド以外の付加モル数を多くする。

【0013】一般式〔1〕の R^3 は水素原子またはメチル基である。一般式〔1〕の M は水素原子またはナトリウムもしくはカリウム等のアルカリ金属原子である。

【0014】一般式〔1〕で表わされるリン脂質誘導体は、例えば次のような2段階の反応により、容易に製造することができる。第1段階目の反応では、ホスホリバーゼD酵素(P.Lase-D)の存在下に、リン脂質とポリアルキレングリコールとを反応させ、ホスファチジル=ポリアルキレングリコールを合成する。このとき使用するホスホリバーゼDとしては、市販品または「J.Bio1.Chem.,242,477-484(1967)」に記載されている方法などにより抽出・精製したものであってもよい。またリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイノシトール、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸などが使用できる。ホスホリバーゼDの使用量は、特に限定されないが、リン脂質1gに対して100～500単位とするのが好ましい。また、リン脂質とポリアルキレングリコールとの仕込モル比は、リン脂質1モルに対してポリアルキレングリコール5～100モルとするのが好ましい。

【0015】反応は酢酸緩衝液、炭酸緩衝液等の水系溶媒、またはこれらの水系溶媒とクロロホルム、ベンゼン、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等の有機溶媒との混合溶媒中で行うのが好ましい。反応温度は0～80℃、好ましくは30～40℃、反応時間は10分間～170時間、好ましくは30分間～24時間とするのが望ましい。このようにして得られたホスファチジル=ポリアルキレングリコールは、そのまま、または再沈殿、カラム処理、吸着剤処理、イオン交換、ゲル濾過、限外濾過、透析などの方法により単離・精製して、次の第2段階目の反応に供する。

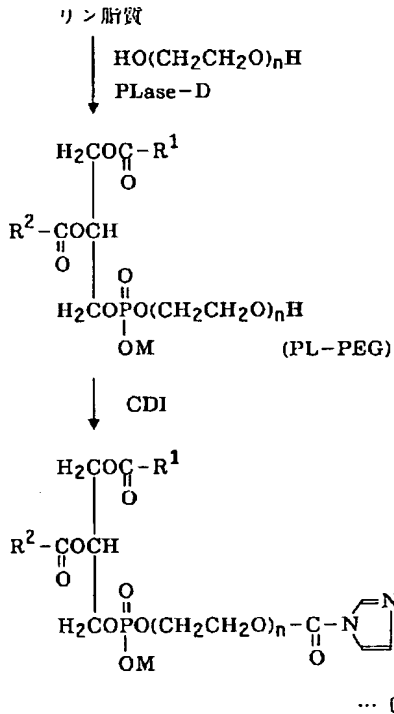
【0016】第2段階目の反応では、第1段階目の反応で得られたホスファチジル=ポリアルキレングリコールに N, N' -カルボニルジイミダゾール(CDI)またはその誘導体を反応させ、目的とするリン脂質誘導体を合成する。両者の仕込モル比は特に限定されないが、ホスファチジル=ポリアルキレングリコール1モルに対して N, N' -カルボニルジイミダゾールまたはその誘導体0.1～100モル、好ましくは1～10モルとするのが望ましい。

【0017】反応はクロロホルム、ベンゼン、トルエン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル等の有機溶媒

中で行うのが好ましい。反応温度は $-100 \sim 100$ ℃、好ましくは $0 \sim 40$ ℃、反応時間は1分間～48時間、好ましくは10分間～6時間とするのが望ましい。反応終了後は、蒸留、再結晶、再沈澱、吸着剤処理、カラム処理、イオン交換、ゲル濾過、限外濾過、透析などの方法により単離・精製することができる。

【0018】ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリコールを用いた場合の反応式を次に示す。なお、式中 R^1 ($C=O$)、 R^2 ($C=O$)、 M および n は前記と同じもの、 $PL-PEG$ はホスファチジル=ポリエチレングリコールを示す。

【化3】



【0019】このようにして得られたリン脂質誘導体は、小胞体形成成分などとして使用することができる。ここで小胞体とは、小胞体形成成分の親水基が界面の水相に向かって配向した構造を有する粒子を意味する。具体的なものとしては、二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソーム、植物油およびリン脂質などの混合物が乳化された脂肪乳剤、またはミセルなどがあげられる。

【0020】本発明のリン脂質誘導体は、アミノ基、水酸基またはチオール基などの官能基、特に第1級アミノ基に対して高い反応性のあるオキシカルボニルイミダゾール基を有しているので、このような官能基を有する機能性物質と容易に反応し、共有結合が形成される。このため、本発明のリン脂質誘導体を小胞体形成成分として用いることにより、小胞体にポリアルキレンオキシド鎖を導入できるとともに、前記官能基を有する機能性物質

製造することができる。

【0021】本発明のリン脂質誘導体を用いて小胞体を製造する場合、リン脂質誘導体は一種単独で、または二種以上組合せて、あるいは小胞体を形成しうる他の小胞体形成成分、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、その他のリン脂質類、コレステロールやイントラリピッド（大塚製薬（株）、商標）、大豆油、サフラワー油などと混合して使用することができ、反応性リポソームをはじめ反応性脂肪乳剤、反応性ミセルなどの反応性小胞体を形成することができる。この場合、小胞体は公知の方法により製造することができる。本発明のリン脂質誘導体を用いて得られた反応性小胞体は、一般式〔1〕で表わされる化合物中のオキシカルボニルイミダゾール基を官能基として利用して、種々の機能性物質を共有結合により導入することができる。

【0022】次に本発明のリン脂質誘導体を用いて製造したそれぞれの反応性小胞体について詳しく説明する。代表的な反応性小胞体である反応性リポソームは、リン脂質誘導体を膜形成成分（小胞体形成成分）として含有するものである。リン脂質誘導体の含有量は、リン脂質誘導体および他の膜形成成分の合計量に対して0.001～100モル%、好ましくは0.5～30モル%であるのが望ましい。0.001モル%未満では期待される効果が小さくなるため、一般的には使用されない。リン脂質誘導体は、一種単独で使用することもできるし、二種以上のものを組合せて使用することもできる。

【0023】リン脂質誘導体と混合して用いられる他の膜形成成分としては、従来からリポソームの膜形成成分として用いられているものが制限なく使用できる。具体的には、ジホスファチジルグリセロール、カルジオリビン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール等のリン脂質および脂肪酸部に不飽和基を有する重合性リン脂質；スルホキシリポリシジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ラクトシルジグリセリド等の糖脂質類；コレステロール等の非極性脂質；その他には、非イオン性界面活性剤、ホスファチジルポリエチレングリコール、「Biochem. Biophys. Acta., 106

6, 29-36(1991)」に記載されているホスファチジルエタノールアミンとポリエチレングリコールとの反応物、およびこれらの混合物などがあげられる。

【0024】反応性リポソームは、リン脂質誘導体およびレシチン、その他のリン脂質、コレステロール等の他の膜形成成分を、有機溶媒等の適当な溶媒に溶解し、エクストルージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆層蒸発法、エタノール注入法、ブレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法など、種々の公知の方法によりリポソーム化することにより製造す

ることができる。また、これらの製造法を選択することにより、多重層リボソーム、小さな一枚膜リボソーム、大きな一枚膜リボソームなど、種々の大きさや形態を有する反応性リボソームを製造することができる。

【0025】このようにして得られた反応性リボソームは、リボソーム膜の内外表面にポリアルキレンオキシドからなるスペーサーを介してオキシカルボニルイミダゾール基が結合しているため、アミノ基、水酸基、チオール基などの官能基、特に第1級アミノ基を有する機能性物質を効率よくかつ簡単にリボソームの二分子膜上にポリアルキレンオキシドからなるスペーサーを介して、ウレタン結合、カーボネート結合またはチオカーボネート結合により化学的に固定化することができる。

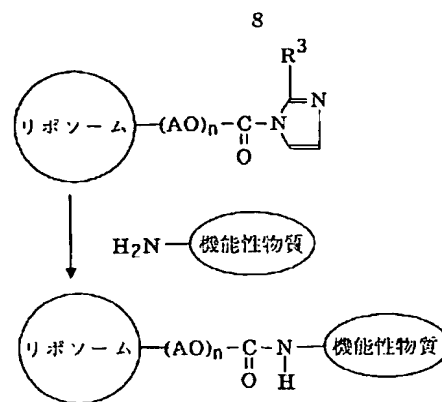
【0026】反応性リボソームに固定化できる機能性物質としては、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、電極感応性化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬などがあげられる。

【0027】反応性リボソーム上への機能性物質の固定化反応は、種々の緩衝液等の水系溶媒、またはこれらの水系溶媒とアセトン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセタミド、ジメチルスルホキシド、ピロリドン等の有機溶媒との混合溶媒中で、反応性リボソームと機能性物質とを $-10\sim 120^{\circ}\text{C}$ 、アミノ基との反応の場合は好ましくは $0\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $0\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、水酸基またはチオール基との反応の場合は好ましくは $40\sim 120^{\circ}\text{C}$ で、5分間 ~ 1000 時間、好ましくは30分間 ~ 72 時間攪拌下に反応させる方法などにより、一段階で容易に行うことができる。これらの条件外では、リボソームの安定性が悪くなるため好ましくない。

【0028】リボソーム表面上でのアミノ基を有する機能性物質の固定化反応を模式的に示すと次のようになる。式中、 R^1 、 AO 、 n は前記と同じものを示す。

【化4】

10



…【3】

【0029】また、反応性リボソームの内部には、一般のリボソームと同様に種々の物質を公知の方法により封入することが可能である。被封入物質としては、例えば色素、染料、放射線ラベル化合物、蛍光化合物、化学発光化合物等の標識物質；光応答性化合物、pH応答性化合物、熱応答性化合物、電極感応性化合物等の外部刺激応答性化合物；酵素、抗体、その他のタンパク質、糖、脂質、糖タンパク質、糖脂質、ホルモン等の生理活性物質；医薬；ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸等の水溶性高分子類などがあげられる。固定化反応または封入操作の終了後は、必要によりゲル濾過、限外濾過、透析、遠心分離、静置沈降分離等の方法により精製を行うことができる。

【0030】機能性物質を固定化したリボソームは、ポリアルキレンオキシド鎖の先端に機能性物質が固定化されているので、ポリアルキレンオキシド鎖に邪魔されることなく機能性物質の作用が十分に発揮される。また、ポリアルキレンオキシド鎖が導入されているので、従来からのポリアルキレンオキシド鎖導入の効果、例えば長期間にわたる血液中濃度の維持、非免疫原性、リボソーム内部に封入した物質の漏れ防止などの効果も期待できる。このため反応性リボソームは、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサー、固定化触媒、バイオリアクター、バイオエレクトロニクス素子、マイクロカプセル代替品など、種々の機能性リボソームとして利用できる。

【0031】なお、反応性リボソームを製造する際、他の膜形成成分として重合性リン脂質を配合することにより、重合性の反応性リボソームとすることができる。重合性のリン脂質としては、公知の重合性リン脂質を使用することができるが、例えば1,2-ジ(2,4-オクタデカジエノイル)-3-ホスファチジルコリンの他、野島庄七、砂本順三、井上圭三編集、1988年南江堂発行の「リボソーム」p313 \sim 315に記載のものなどがあげられる。これらの中では、1,2-ジ(2,4-オクタデカジエノイル)-3-ホスファチジルコリンが好ましい。

50

【0032】重合性リボソームは、リボソーム調製後に、光重合開始剤の存在下または非存在下でUV、 γ 線、電子線などの光照射を行うことにより、あるいはレドックス開始剤系により、あるいはアゾ系開始剤または有機過酸化化物などの存在下で加熱を行うことにより、容易に重合を行うことができる。このようにして得られた重合後のリボソームは、優れた安定性を有しているの

で、水溶液に分散させたままで、あるいは凍結乾燥等により粉末状に調製し、安定して使用することができる。

【0033】他の反応性小胞体としての反応性脂肪乳剤は、本発明のリン脂質誘導体と、大豆油、サフラワー油等の植物油と、大豆レシチン、卵黄レシチン等のリン脂質と、必要により添加される他の添加剤、例えばイントラリピッド（大塚製薬（株）製、商標）、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、脂溶性医薬、脂溶性生理活性物質などを含む油脂混合物が乳化されたものである。油脂混合物中に占めるリン脂質誘導体の含有量は、0.001～50モル%、好ましくは0.5～30モル%であるのが望ましい。

【0034】反応性脂肪乳剤は、公知の方法により製造することができる。例えば、本発明のリン脂質誘導体、植物油、他のリン脂質および必要により配合する添加剤を混合、加熱し、水を加えてホモミキサー等で粗乳化し、次にマントン-ガウリン型の加圧噴射式ホモジナイザー等で均質化する方法などにより製造することができる。

【0035】このようにして得られた反応性脂肪乳剤には、反応性リボソームの場合と同様にして、同様の機能性物質を容易に固定化することができる。このため反応性脂肪乳剤は、医薬の運搬体、検査薬、診断薬、センサ

ー、固定化触媒などとして利用できる。

【0036】上記以外の反応性小胞体である反応性ミセルは、本発明のリン脂質誘導体だけからなるものであっても、レシチン、その他のリン脂質、コレステロール等の他の成分が含有されているものであってもよい。反応性ミセルも反応性脂肪乳剤と同様にして機能性物質を固定化することができ、同様の用途に利用できる。

【0037】

【発明の効果】本発明のリン脂質誘導体は新規かつ有用である。本発明のリン脂質誘導体を小胞体形成成分として用いることにより、小胞体にポリアルキレンオキシド鎖を導入できるとともに、このポリアルキレンオキシド鎖の先端に、簡単にかつ効率よく種々の機能性物質を共有結合により固定化することができ、しかも機能性物質の導入量を多くすることができる。

【0038】

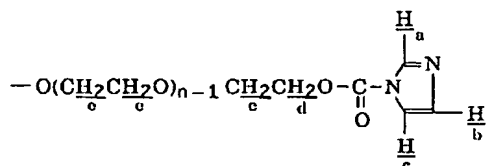
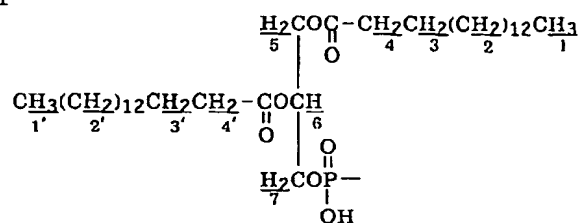
【実施例】以下、実施例により、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

ジバルミトイルホスファチジルコリン0.5g（0.65mmol）およびポリエチレングリコール（ $M_w \approx 2000$, $n \approx 45$ ）5g（1.7mmol）を溶解させたクロロホルム溶液40mlに、ホスホリパーゼD（東洋醸造（株）製）40単位を溶解させた1M酢酸緩衝液（pH5.6）20mlを加え、40℃で12時間攪拌して反応させた。次に、0.1N水酸化ナトリウム水溶液で中和した後、有機層を減圧下で濃縮した。得られた反応混合物をシリカゲルカラム（20%メタノール/クロロホルム）を用いて分画し、濃縮した後、少量のクロロホルムに溶解させ、これをジエチルエーテルに再沈殿することにより、ジバルミトイルホスファチジル=ポリエチレングリコールを得た（収率30%）。

【0039】次に、乾燥させたクロロホルム10ml中に、上記ジバルミトイルホスファチジル=ポリエチレングリコール100mg（0.27mmol）およびN,N'-ジカルボニルイミダゾール87mg（0.54mmol）を加え、室温で6時間攪拌した。得られた反応混合物をジエチルエーテル100ml中に再沈殿させ、目的の下記反応性リン脂質誘導体を得た（収率92%）。反応の進行は、IRスペクトル（KBr法）において、ポリエチレングリコール末端の水酸基（OH伸縮、3428 cm^{-1} ）の消失およびオキシカルボニルイミダゾール基（カルボニル結合）の生成（C=O伸縮、1760 cm^{-1} ）により確認した。

【化5】



n ≒ 45

【0040】精製物は、¹H-NMRおよびIRスペクトルにより確認した。結果は次の通りである。

¹H-NMR (CDCl₃, δ; ppm, 270MHz)

8.14 (a; s, 1H)

7.43 (b; s, 1H)

7.08 (c; s, 1H)

5.23 (6; m, 1H)

4.67 (d; t, 2H, J = 2.5)

4.00 (5, 7; m, 4H)

3.65 (e; m, 約180H)

2.31 (4, 4'; m, 4H)

1.60 (3, 3'; m, 4H)

* 1.29 (2, 2'; m, 48H)

0.90 (1, 1'; m, 6H)

IR: (KBr, cm⁻¹)

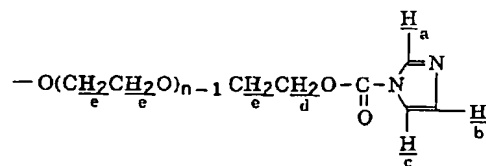
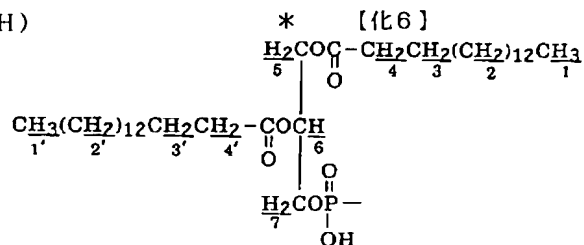
20 1760 (オキシカルボニルイミダゾール基, C=O伸縮振動)

1728 (エステル, C=O伸縮振動)

【0041】実施例2

実施例1と同様にして、ただしポリエチレングリコールの代わりに分子量約5000 (n ≒ 115) のポリエチレングリコールを用いて、目的の下記反応性リン脂質誘導体を得た。

【化6】



n ≒ 115

【0042】精製物は、¹H-NMRおよびIRスペクトルにより確認した。結果は次の通りである。

¹H-NMR (CDCl₃, δ; ppm, 270MHz)

8.14 (a; s, 1H)

7.43 (b; s, 1H)

7.08 (c; s, 1H)

5.23 (6; m, 1H)

4.67 (d; t, 2H, J = 2.5)

4.00 (5, 7; m, 4H)

3.65 (e; m, 約455H)

2.31 (4, 4'; m, 4H)

50 1.60 (3, 3'; m, 4H)

14

* 実施例 1 と同様にして、ただしポリエチレングリコールの代わりに、(オキシエチレン基) p / (オキシプロピレン基) q / (オキシエチレン基) r がブロック状に付加したポリアルキレングリコール (p ≒ 20、q ≒ 5、r ≒ 20) を用いて、目的の下記反応性リン脂質誘導体を得た。

【化7】

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{COC}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3 \\ \text{5} \quad | \quad \text{4} \quad \text{3} \quad \text{2} \quad \text{1} \\ \quad \quad \text{O} \end{array}$$
[illegible]
$$\left[\text{---} \left(\underset{\text{g}}{\text{CH}_2} \overset{\overset{\text{CH}_3}{\text{h}}}{\underset{\text{f}}{\text{CHO}}} \right)_q \left(\underset{\text{c}}{\text{CH}_2} \underset{\text{e}}{\text{CH}_2} \text{O} \right)_{r-1} \right] \text{---} \underset{\text{e}}{\text{CH}_2} \underset{\text{d}}{\text{CH}_2} \text{O} \text{---} \underset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}} \text{---} \text{N} \begin{array}{c} \text{H}^{\text{a}} \\ \text{=N} \\ \text{=N} \\ \text{H}^{\text{c}} \end{array} \text{---} \text{H}^{\text{b}}$$

$p \equiv 20, \quad q \equiv 5, \quad r \equiv 20$ (ブロック状に付加)

4. 00 (5, 7 ; m, 4 H)

3. 60 (e、f、g、j ; m、約190H)

2. 31 (4, 4' ; m, 4 H)

1. 60 (3, 3' ; m, 4H)

1. 26 (2, 2' ; m, 48 H)

1. 12 (h ; m, 15 H)

0. 88 (1, 1' ; t, 6H, J = 6. 4)

30